

526,744

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/022585 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07K 14/02, C12N 7/00, G01N 33/576, A61K 39/29, A61P 1/16, 31/12
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011389
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 5 日 (05.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-261666 2002 年 9 月 6 日 (06.09.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社先端生命科学研究所 (ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.) [JP/JP]; 〒351-0112 埼玉県 和光市 丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ): 榎 昇 (MAKI, Noboru) [JP/JP]; 〒351-0112 埼玉県 和光市 丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内 Saitama (JP). 木村 達治 (KIMURA, Tatsuji) [JP/JP]; 〒351-0112 埼玉県 和光市 丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内 Saitama (JP). 八木 慎太郎 (YAGI, Shintaro) [JP/JP]; 〒351-0112 埼玉県 和光市 丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HBV PRECORE PROTEIN CAPABLE OF FORMING PARTICLES

(54) 発明の名称: 粒子形成能を有するHBVプレコア蛋白質

(57) Abstract: It is intended to provide an HBV precore protein capable of forming particles and a means of assaying the same. A novel HBV precore protein forming HBV virus-like particles is identified. Thus, this novel HBV precore protein is provided. It is also intended to provide core-like particles and virus-like particles formed by this HBV precore protein. These virus-like particles are usable in vaccines and remedies. Moreover, it is intended to provide a method of assaying the HBV precore protein and a method of assaying an anti-HBV precore protein antibody.

(57) 要約: 粒子形成能を有するHBVプレコア蛋白およびその測定手段を提供する。HBVのウイルス (様) 粒子を形成する新規なHBVプレコア蛋白を同定した。本発明はこの新規なHBVプレコア蛋白を提供する。さらにこのHBVプレコア蛋白によって形成される、コア様粒子、ウイルス様粒子を提供する。このウイルス様粒子はワクチン、治療薬に利用できる。さらに本発明はHBVプレコア蛋白の測定法および抗HBVプレコアタンパク抗体の測定法を提供する。

WO 2004/022585 A1

BEST AVAILABLE COPY

Rec'd

JP/PTO

07 MAR 2005

明 細 書

粒子形成能を有するHBVプレコア蛋白質

技術分野

本発明は、HBVウイルスのコア様粒子形成が可能なHBVプレコア蛋白質に関する。

背景技術

ウイルス感染の診断は、主にウイルスやウイルス関連成分（蛋白や核酸）を検出する方法と、ウイルス感染により生体が産生する特異抗体を測定する方法とによって行われる。B型肝炎ウイルス（HBV）感染においては、HBs抗原・抗体、HBc抗体、HBe抗原・抗体、HBV-DNAなどの診断マーカーが臨床検査法として導入されている。

通常、HBV感染の有無はHBs抗原やHBc抗体により知ることができる。また、HBVの感染性のみならず、HBVキャリアの病態や予後、治療の効果判定の指標としては、HBe抗原・抗体、HBV-DNA量の測定が用いられる。中でもHBe抗原・抗体免疫測定法は操作が簡便で安価なため最も汎用されているが、HBe抗原を産生・分泌できないプレコア変異株では、HBe抗原が陰性であってもHBVの増殖が旺盛で、感染性や免疫原性が強く病態も活動的な症例が存在する。一方、野生株や変異株にかかわらず、HBVの増殖・複製状態を反映するHBV-DNA量の測定が重要となるが、前処理法や測定法が煩雑で、再現性や安定性に欠けるという問題点がある。

最近、HBVコア関連抗体（HBc抗体およびHBe抗体）の存在下や変異株の出現にかかわらず、HBVの増殖・複製状態を反映すると考えられるHBVコア関連抗原を測定する方法が開発された。Kimuraら(Jo

urnal of Clinical Microbiology, 40, 439-445, 2002) は、HBVコア関連抗原（HBc抗原及びHBe抗原を含むHBVプレコア/コア遺伝子産物）に対して特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、簡便な前処理法により血清中のHBc抗原とHBe抗原を同時に検出する免疫測定方法を開発し、ウイルスゲノムを検出するNAT検査法と相関を持つことを示した。

これまでの文献報告では、HBVプレコア/コア遺伝子は全長212アミノ酸残基（アミノ酸番号：-29～183（HBc抗原の一番目のアミノ酸を1とした場合。以下同様））からなるタンパクをコードし、そのN末端には19残基のシグナルペプチドを有する。シグナルペプチドとは疎水性のアミノ酸残基からなり、分泌蛋白が膜に結合するためのシグナル配列として機能する。ここでは-29～-11番目のアミノ酸からなる配列を指す。

プレコア蛋白は翻訳されると小胞体膜を通過し19残基のシグナルペプチド切断後、C末端核酸結合ドメインが切断されHBe抗原（アミノ酸番号：-10～149）となり血中に分泌される。従来このHBe抗原は血中ではアルブミンやγグロブリンなどの血清蛋白と結合して存在すると考えられ、HBV粒子を形成しているとの報告はなかった。またHBe抗原は、免疫寛容の維持、ウイルス複製の抑制などにかかわっているとの報告も見られるが、HBVの複製には不可欠ではなく、その生物学的役割については不明な点が多い。

また、HBVプレコア/コア遺伝子は2番目の転写開始シグナルを持ち、この開始シグナルから転写翻訳された産物はHBc抗原（アミノ酸番号：1～183）となり、HBV pregenome RNAを取り込みながらウイルスキャプシドを形成し、HBs抗原からなる外皮（エンベロープ）をまとった後、細胞外に完全ウイルス粒子（Dane粒子）として放出される。このHBc抗原のうち、1～144番目のアミノ酸が存在すれば、

コア粒子の形成が起こることが報告されているが、感染性のウイルスのコア粒子を形成している分子は1-183番目のアミノ酸配列の蛋白から構成されていると考えられている。

上記のようにHBc抗原とHBe抗原は、大部分共通の配列を持つ蛋白でありながら大きく異なる性質を持っている。この性質の違いに重要な働きをしているのはHBe抗原のアミノ酸-7番目にあるシステイン残基である。このシステインは同じ分子内のアミノ酸61番目のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し、e抗原性を獲得する(M. Nassal and A. Rieger, Journal of Virology, 67; 4307-4315, 1993)。-7番目のシステインを他のアミノ酸に変異させるなどしてこのジスルフィド結合を形成できないようにすると、HBe抗原のコンフォメーションはとらないことからこのジスルフィド結合の重要性が示されている。

一方HBc抗原は1番目のアミノ酸部位から転写翻訳されるためアミノ酸-7番目にあるシステイン残基を持たず、HBcコンフォメーションをとり、2分子のHBc蛋白がアミノ酸61番目のシステイン残基どうしのジスルフィド結合形成によりホモ2量体となり、ウイルスキャプシド(コア粒子)を形成する。

HBV患者血清中に存在するHBVコア関連抗原は、主に感染性を有するDane粒子を構成するHBc抗原(アミノ酸番号: 1~183)、および、HBc抗原とアミノ酸配列上はほとんど同様であるがHBc抗原とは抗原性が異なる分泌性のHBe抗原(アミノ酸番号: -10~149)に大別される。しかしながら、この他に血中のマイナー分子としてHBe抗原性を示すプレHBe抗原(アミノ酸番号: -29~149)の存在がTAKAHASHIら(Journal of Immunology, 147, 3156-3160, 1991)により明らかにされている。

彼らはプールした血清を超遠心で分離し、上清より抗HBeモノク

ローナル抗体のアフィニティーカラムでHBe抗原性を持つ蛋白を精製し、その配列を決定した。HBs抗原蛋白質は前述したように、ウイルス粒子を形成せず血中に存在すると考えられる。彼らもHBVの外皮蛋白であるHBs抗原を剥離（破壊）する処理あるいはウイルス粒子、コア粒子を破壊するような処理を行わずに精製したHBe抗原配列を決定しており、彼らが証明したシグナル配列を持つHBe抗原（アミノ酸番号：-29～149）は血清中に遊離して存在すると考えられる。

また一方で、Dane粒子の中には、HBV-DNAを含まない空粒子（SAKAMOTO et al. Laboratory Investigation, 48, 678-682, 1983）やスプライシングを受けた通常より短いHBV-DNAを含む複製不可能な欠損粒子が存在すること（TERRE et al. Journal of Virology, 65, 5539-5543, 1991）が報告されているが、その粒子を形成しているHBVタンパクの詳細な解析は行われていない。

このように、これらの文献で解析されている血中でのHBVコア関連抗原の生化学的分析は十分とはいえず、HBVの増殖・複製状態を反映すると考えられるHBVコア関連抗原のウイルスマーカーとしての血中における存在様式は未解明のままである。

発明の開示

臨床的有用性の高いHBVのNAT検査には、現在PCR法及びTMA法があるが、検査コストが高く付く上に操作が煩雑であることが問題点として挙げられる。また、遺伝子増幅法を用いているため、増幅用プライマーが標的DNAと一致しないと偽陰性を引き起こす。一方、免疫測定法は操作が簡便で安価に測定できるが、増殖マーカーとしての現行のHBe抗原測定法では、HBe抗体の存在下では免疫複合体として存在するHBe抗原を測定できないし、HBe抗原を産生・分泌できな

いプレコア変異株、コアプロモーター変異株では、HBe抗原が陰性となる。また、HBc抗原測定法は、HBV-DNA量と相関はあるものの、前処理が繁雑で感度不足のため臨床応用されていない。

従って本発明の目的は、B型肝炎のスクリーニングやB型慢性肝炎患者の治療におけるモニタリングなどに臨床応用されと考えられるHBVコア関連抗原を生化学的に分析し、HBVの増殖・複製状態を反映する血中のHBVコア関連抗原の分子種を同定することである。

こうした解析により、HBV感染患者の診断等に有用な分子種を発見し、新たな診断薬を開発することができる。

また、HBVコア関連抗原の存在様式およびその役割を解析することで、新たなHBVワクチン、治療薬の開発につなげることができる。

本発明は、血中のHBV粒子及びHBV関連蛋白をショ糖密度勾配遠心法やELISA、電気泳動法等を用いることで、HBVコア関連抗原を分離精製し、従来報告されているHBe抗原及びHBc抗原とは異なる抗原を単離し、質量分析法により新規なコア様粒子を形成する分子を同定した。本発明の1つの態様はウイルス様粒子形成能のあるシグナル配列の全部または一部を含むHBVプレコア蛋白を提供することである。

ここで一部とは19残基のシグナル配列のうちN末側からの1残基以上の配列である。またこのHBVプレコア蛋白のC末端はアミノ酸番号で150番目以降のRRRGRのいずれかの部位で切断されたものである。さらにシグナル配列あるいはHBe配列部分（アミノ酸番号：10～149）に変異を含んでも良く、許容される変異はコア様粒子を形成できる範囲ならば構わない。このHBVプレコア蛋白は、最も好ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

さらに本発明は上記のHBVプレコア蛋白を含んでなるHBVコア様粒子またはHBVウイルス様粒子を提供する。

またこのHBVプレコア蛋白、あるいはこの蛋白から構成されたHBVコア様粒子、HBVウイルス様粒子を含むHBV診断薬あるいはキットを提供する。

さらにこのHBVプレコア蛋白を測定する方法、あるいは診断薬、診断キットを提供する。

このHBVプレコア蛋白の測定法はHBVプレコア蛋白を露出させる工程、HBVプレコア蛋白を認識するプローブと結合させる工程を含んでもよい。またHBVプレコア蛋白を露出させる工程が界面活性剤の処理または添加であっても良い。この界面活性剤は限定されず非イオン性界面活性剤も有効であるが、特に陰イオン性界面活性剤が適している。また陰イオン性界面活性剤に両イオン性界面活性剤を加えたもの、さらに非イオン性界面活性剤を加えたものも効果がある。

さらに前記HBVプレコア蛋白に結合するプローブがアミノ酸番号の-28~-11の配列に結合するプローブであっても構わない。このプローブが抗体であっても良い。

また、抗HBs抗体により免疫沈降を行い、沈降物中のHBVプレコア／コアタンパクを測定することにより、遊離のHBe抗原を除いた粒子状HBVプレコア／コアタンパクのみを特異的に測定することも可能である。この免疫沈降はHBs抗原に結合するプローブを用いた分離法によって置き換えることもできる。

上記の測定法により測定したHBVプレコア蛋白の測定値にHBe抗原の値が含まれている場合に、HBe抗原の測定値を減算することにより検体中の粒子状HBVプレコア蛋白の値を算出し、測定することも可能である。さらにその値よりHBc抗原の測定値を減算することに

より検体中の粒子状HBVプレコア蛋白の正確な値を測定することも可能である。この測定した粒子状HBVプレコア蛋白の定量値はHBV感染の病態マーカーとして利用できる。

さらに本発明は陰イオン性界面活性剤およびHBVプレコア蛋白の-28~150番目のアミノ酸を認識する抗体を含む測定キットおよびHBe抗原を測定するキットを含む診断薬を提供する。

本発明の別の形態としてHBVプレコア蛋白を含んでなるHBVワクチン、および治療薬を提供する。

これらに加え、本発明は粒子状HBVプレコアタンパクに対する抗体を測定する方法、あるいは診断薬、診断キットを提供する。

これらには上記のHBVプレコアタンパク粒子を抗原として用いることができる。この粒子は血清中などから密度勾配遠心、免疫沈降などで精製することで得られ、界面活性剤等でエンベロープを除去することで、HBVプレコアタンパク抗原を露出させることができる。また、リコンビナントタンパクにより、粒子状HBVプレコアタンパクを製造することも可能である。

この抗原を用いることにより、HBc抗体、HBe抗体とは異なる粒子状HBVプレコアタンパクに対する抗体を測定することができる。

図面の簡単な説明

図1は、HBVプレコア蛋白、HBe抗原、シグナル配列を持つHBe抗原、およびHBc抗原のアミノ酸の領域と各抗原の血液中での様態を示す図である。

図2は、ショ糖密度勾配遠心法にて分離したHBe抗原陽性血清のHBV抗原、HBV DNAの挙動を示す図である。各分画中のHBVコア関連抗原（黒正方形）、HBc抗原（●）、HBs抗原（◇）、HBe抗原（□）、およびHBV DNA（○）をそれぞれ示し、分画の密度を破線で示す。

図 3 は、シ ョ糖密度勾配遠心法にて分離したHBVコア関連抗原ピーク画分を再びシ ョ糖密度勾配遠心法にて分離したときのHBV抗原、HBV DNAの挙動を示す図である。各分画中のHBVコア関連抗原（黒正方形）、HBc抗原（●）、HBs抗原（◇）、およびHBV DNA（○）をそれぞれ示し、分画の密度を破線で示す。

図 4 は、HBV抗原のゲルろ過での挙動を示す図である。上図、シ ョ糖密度勾配遠心法にて分離したHBVコア関連抗原ピーク画分を、未処理のままゲルろ過した場合。下図、同じサンプルを3% NP-40処理後ゲルろ過した場合。各分画中のHBVコア関連抗原（黒正方形）、HBc抗原（●）量を示す。分子量マーカーの溶出位置を上部に示す。

図 5 は、HBe抗原陽性血清およびその密度勾配遠心分画をウエスタンブロット解析した結果を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。密度勾配遠心分画1～20がシ ョ糖濃度10～60%に相当する。HB50はHBc抗原にのみ反応し、HB91はHBc抗原HBe抗原両方に反応するモノクローナル抗体である。

図 6 は、それぞれの症例での粒子状プレコアタンパクの全プレコア/コアタンパクに対する比率を示す図である。HBe抗原陽性例を（●）で、HBe抗体陽性例を（○）で示す。

発明の実施の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明で新規に同定したHBVプレコア蛋白とは、シグナル配列を含み且つHBVのウイルス様粒子を形成することのできる蛋白質である。血液中の本発明の蛋白質の主な分子は分子量22000ダルトンからなるp22抗原である。p22抗原の代表的なアミノ酸配列は配列番号1に記載される178アミノ酸からなるHBVのプレコア抗原に類似の抗

原である。この抗原を特異的に認識する抗体を取得し、検体前処理法と組み合わせて測定系を構築することにより、抗体存在下でもHBVコア関連抗原を測定することが可能となる。

一般的にHBVプレコア/コア蛋白と呼ばれ得るものにはHBe抗原（HBV e蛋白）、HBc抗原（HBVコア蛋白）および他のHBVプレコア/コア遺伝子産物がある。本発明において「HBVプレコア蛋白」と呼ぶ場合には、特に断らない限りシグナル配列を含み粒子形成能を有するHBVプレコア/コア遺伝子産物である蛋白を示す。この代表的なものは配列表1に示す蛋白である。また、「HBVコア関連抗原」はHBc抗原（HBVコア蛋白）、HBe抗原（HBV e蛋白）を含むHBVプレコア/コア遺伝子産物を示す。

まず、B型肝炎患者血清をショ糖密度勾配遠心法にて分画し、各分画のHBVコア関連抗原を測定したところ、HBe抗原と同様の密度1.05付近に一つのピークを、密度1.17付近のHBc抗原とHBV-DNAとほぼ同じ分画に、もう一つのピークを検出できる。さらに、密度1.17付近のピークを低勾配のショ糖密度勾配遠心法にて再分画すると、HBc抗原とHBV-DNAは同じ分画にピークを示すが、HBVコア関連抗原はこれよりわずかに低密度分画にピークを示し、その分画にはウイルスの外被蛋白であるHBs抗原が検出できる。

すなわち、B型肝炎患者血清中には、感染性を示すDane粒子のほかに、少し比重の軽いHBVコア関連抗原からなるウイルス様粒子が存在すると考えられる。

また、そのHBVコア関連抗原からなる粒子とDane粒子を含む画分をゲルろ過にかけると、HBc抗原とHBVコア関連抗原からなる粒子がそれぞれボイド画分に溶出する。また、同じ画分をノニデットP-40（NP-40：ナカライテスク）処理し、外被蛋白のHBs抗原を剥がした後、ゲルろ過にかけると、HBc抗原とHBVコア関連抗原からなる

粒子はやはりそれぞれボイド画分に溶出する。このことは、HBc抗原とHBVコア関連抗原からなる各々の粒子が、外被蛋白のHBs抗原を剥がされる界面活性剤処理によっても壊されない強固なキャプシド構造を形成していることを示している。

つぎに、ウェスタンプロット法を用いた解析から、そのHBVコア関連抗原はHBc抗原とほぼ同じ22000ダルトンの分子量を示したが、HBc抗原が有するC末端核酸結合領域に特異的なモノクローナル抗体（HB50）には反応しない。つまり、このHBVコア関連抗原は、その分子量からC末端核酸結合領域を含まず、シグナル配列の切断されていないプレコア遺伝子産物（p22抗原）と考えられる。

p22抗原をSDS-PAGE法にて分離後、ポリアクリルアミドゲルより切出し、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析法（Carr et al. Carrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York Units, 1997）によりアミノ酸配列を決定すると、p22抗原は配列番号1に記載の178アミノ酸からなるHBVプレコア蛋白であることが明らかとなった。

このアミノ酸配列を決定したHBVコア関連抗原を以下HBVプレコア蛋白と呼ぶが、本発明のHBVプレコア蛋白は従来TAKAHASHIら（Journal of Immunology, 147, 3156-3160, 1991）によって報告されていたHBVプレコア蛋白（プレHBe抗原）と比較するとN末（-29番目）のメチオニンを欠いており、-28番目のグルタミンがアセチル化されている。またC末側はHBe抗原のC末である149番目のバリンにアルギニンが結合しており、少なくとも150番目までが存在している。このHBVプレコア蛋白はHBV核酸結合部位のうちSPRRRを含む部位を認識するモノクローナル抗体HB50では認識されないことから、154番目までのアミノ酸を含む可能性がある。

本発明のHBVプレコア蛋白が不完全ウイルス粒子（ウイルス様粒

子)を形成することから、このタンパクがキャプシド形成にあたりHBc抗原と競合してウイルス複製を阻害することが容易に推測される。したがって、本発明はHBVプレコア蛋白を用いたHBV治療薬の可能性を提示する。

本発明のHBVプレコア蛋白はHBV感染患者の体内で、HBVウイルス様粒子を形成している。また本発明は、このHBVプレコア蛋白が完全HBVウイルス粒子中に存在することも示唆している。すなわち、HBVプレコア蛋白がHBc抗原と共にHBVヌクレオキャプシドを形成していると考えられる。したがって、このHBVプレコア蛋白を測定することはHBV感染の診断、肝炎や肝硬変あるいは肝癌の病態の診断、マーカーとして役立つと考えられる。

本発明のHBVプレコア蛋白と既知のHBe抗原、HBc抗原はその機能やアミノ酸配列が異なる。しかしながら、機能的に似ている性質やアミノ酸配列の重複があるため、このHBVプレコア蛋白を測定するためには、HBe抗原、HBc抗原と区別して測定することが必要である。ただし、後述の実施例7に示すようにこのHBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原の量の比は12:1~158:1と最低でも12倍以上の開きがある。

本発明のHBVプレコア蛋白とHBe抗原あるいはTakahashiらの報告しているシグナルペプチドを持つHBe抗原との違いは、機能的に前者がHBVのコア様粒子(ウイルス様粒子)を形成しているのに対し、後者が遊離の状態では血清蛋白と結合して存在している点である。このコア様粒子(ウイルス様粒子)を形成するという機能に関してはこのHBVプレコア蛋白とHBc抗原は、ほぼ同じ機能を有している。このHBVプレコア蛋白は粒子形成という性質を持つことから、HBe抗原よりはHBc抗原に近い構造を有しているものと推測され、アミノ酸7番目のシステインと61番目のシステイン間のジス

ルフィド結合は形成されていないものと考えられる。

後述の実施例 9 に示すようにHBVコア関連抗原測定系により検出されたHBVコア関連抗原（HBVプレコア/コアタンパク）を従来のHBc抗原測定法やHBe抗原測定法で測定した場合、HBc抗原やHBe抗原は検出されなかった。これは次のようなことを示していると考えられる。①HBVコア関連抗原は本願発明のHBVプレコアタンパクを多く含んでいる。②従来取得されていたHBc抗原やHBe抗原に結合する抗体がHBVプレコアタンパクに結合しないものがあり、HBVプレコア抗原の抗原性がHBc抗原やHBe抗原と異なる。

このことは本発明のHBVプレコアタンパクは従来のHBc抗原測定法やHBe抗原測定法ではほとんど検出されていなかったことを示している。つまり木村らのHBVコア関連抗原測定法により始めて測定可能となったと考えられる。HBVプレコアタンパクはHBVコア関連抗原測定法によって検出できる。この測定系の特徴は界面活性剤でHBVプレコアタンパクを含んだ検体を処理し、界面活性剤の存在下で抗体と反応させることである。そのため、HBVプレコアタンパク上の抗原エピトープは界面活性剤の存在下で安定であることが必要である。さらに抗体も界面活性剤の存在下で機能的に安定な抗体を使用する必要がある。

このような抗体の認識するエピトープはHBVコア蛋白のアミノ酸 1－19番目、21－40番目、31－49番目、131－140番目のリニアエピトープ、および 1－81番目の構造エピトープが適当である。これらのエピトープを認識する抗体を組み合わせることによってHBVプレコアタンパクを測定することが可能となった。これらのエピトープを認識する抗体を 2 つ以上組み合わせることによってHBVプレコアタンパクを検出することができるが、特に好適な組み合わせはアミノ酸 21－40番目と 31－49番目、1－19番目と 21－40番目、21－40番

目と31-49番目のエピトープを認識する抗体の組み合わせであり、これらの組み合わせに他のエピトープを認識する抗体を加えることによって、検出感度が上昇する。

検出に用いる抗体は界面活性剤の存在下で上記のエピトープと結合することができる抗体でなければならない。HBVプレコアタンパク測定に用いる界面活性剤は陰イオン性界面活性剤が好適であるが、陰イオン性界面活性剤と両イオン性界面活性剤の組み合わせ、陰イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤を組み合わせることによりさらに感度が上昇する。陰イオン性界面活性剤の中ではSDSがもっとも好適であったが、その他の陰イオン性界面活性剤も効果があり、SDSを他の構造の類似した陰イオン性界面活性剤に置き換えることにより、HBVプレコアタンパクの上記のエピトープを露出させ、抗体と結合できる状態にすることができる。

また本発明のHBVプレコア蛋白と既知のHBe抗原、Takahashiらの報告しているシグナルペプチドを持つHBe抗原、HBc抗原のアミノ酸配列に関する相違点は図1に示した。HBVプレコア/コア蛋白は本発明より-28~150番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドが代表的なものであると考えられる。これに対し、HBe抗原は-10~149番目のアミノ酸配列、シグナルペプチドを持つHBe抗原は-29~149番目のアミノ酸配列、HBc抗原は1-183番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドで構成されている。

上記のようなことから、本発明のHBVプレコア蛋白とHBe抗原、シグナルペプチドを持つHBe抗原、HBc抗原を分離して測定するのは容易ではないが、そのウイルス（様）粒子を形成できるかできないかの機能と、アミノ酸配列の違いを利用して分離することが可能である。

まず本発明のHBVプレコア蛋白とHBe抗原あるいはシグナルペプチドを持つHBe抗原を分離するためには、このHBVプレコア蛋白はHBV様粒子を形成しており、HBe抗原あるいはシグナルペプチドを持つHBe抗原は遊離の状態（本願では抗体と結合しているHBe抗原も遊離とする）で存在しているという特徴を利用する。実際には、

(1)ウイルス粒子を破壊する処理を行う前に測定した測定値とウイルス粒子を破壊する処理を行った後に測定した測定値を比較する方法がある。つまりウイルス粒子を破壊する処理を行った後に測定した測定値からウイルス粒子を破壊する処理を行う前に測定した測定値を引くことによって測定可能である。

(2)またウイルス（様）粒子を分離して、その中に含まれているHBVプレコア蛋白を測定する方法もある。このウイルス（様）粒子を分離する方法には、例えば密度勾配遠心で遊離の抗原の分画とウイルス（様）粒子を形成している分画を分ける方法があり、ウイルス（様）粒子の含まれている分画のHBVプレコア/コア蛋白を測定すればよい。この密度勾配遠心で遊離の抗原とウイルス（様）粒子を分離する方法以外にも、ウイルス（様）粒子を特異的に濃縮する方法や遊離の抗原を特異的に除く方法を用い、分離後にHBVプレコア/コア蛋白の量を測定すればよい。

このような方法のひとつとして、例えば抗HBs抗体による免疫沈降法があげられる。抗HBs抗体により免疫沈降を行い、沈降物中のHBVプレコア/コアタンパクを測定することによりHBe抗原を除いた粒子状HBVプレコア/コアタンパクのみを特異的に測定することも可能である。

またHBVプレコア蛋白とHBc抗原はコア（様）粒子（ウイルス（様）粒子）の形成の機能で類似しているため、分離して測定するためには構成するアミノ酸配列が異なる部分に特異的に結合（認識）す

るプローブを使い分ける方法が考えられる。つまり、HBVプレコア蛋白を選択的に測定するためには、-29~-10番目のアミノ酸に結合するプローブを使用すればよく、HBc抗原を選択的に測定するためには151~183番目に結合するプローブを使用すればよい。

また、両方に結合するプローブを使用し、HBVプレコア蛋白+HBc抗原の抗原量を測定し、その後いずれかの抗原（蛋白）を特異的に測定し、減算することによっても、それぞれの抗原（蛋白）の量を測定可能である。

實際上、検体中のHBVプレコア蛋白の測定には、ウイルス様粒子の破壊を行い、HBVプレコア蛋白を露出させる工程が必須である。この工程ではウイルスの外皮蛋白質であるHBs抗原の剥離を行い、HBVプレコア蛋白を遊離させる処理剤を使用する。処理の方法としては、アルカリ処理があり、NaOH等の処理により、HBs抗原がはがれ、HBVの内部の抗原が遊離する。また他の処理剤としては界面活性剤が使用可能であり、Triton X-100やNonidet P-40のような非イオン性界面活性剤やSDSやサルコシン酸ナトリウムのような陰イオン性界面活性剤が適当である。さらに特許3171827号に出願されているような陰イオン性界面活性剤と他の界面活性剤の組み合わせも有効である。

このウイルス様粒子の破壊、HBVプレコア蛋白の露出の工程を行わずに、-29~149のアミノ酸を認識するプローブで測定を行うと遊離のHBe抗原あるいはシグナルペプチドを持つHBs抗原をも測定することとなる。そのため遊離の抗原とウイルス様粒子の分離を行わずに、検体中の抗原蛋白を測定した場合は、界面活性剤等による処理を行った測定値から界面活性剤などの処理を行わずに測定したHBe抗原の測定値を減算したものが、粒子状HBVプレコア/コア蛋白の測定値となると考えられる。

界面活性剤によるウイルス粒子の破壊、HBVプレコア蛋白の露出（露呈）の後、HBVプレコア蛋白を認識するプローブによる測定の工程がある。この工程ではアミノ酸配列の-28～150番目を認識するプローブを用いることにより、HBVプレコア蛋白の測定が可能である。プローブとしてはこのプレコア蛋白に結合するものであればよく、抗体、レセプター、アプタマー、リガンドなどが使用可能である。

測定法としては、HBVプレコア蛋白とプローブの結合を利用したものであれば良く、代表的なものとしては酵素抗体免疫法などがある。HBVプレコア蛋白とHBc抗原を分離して測定するためには、HBVプレコア蛋白は-28～-11を認識するプローブを使用し、HBc抗原は151-183を認識するプローブを使用すればよい。しかしながら、共通領域である1-150を認識するプローブでHBVプレコア蛋白とHBc抗原の合計の量を測定し、それから151-183を認識するプローブを用い、HBc抗原の量を測定し、合計の量から減算することによっても、HBVプレコア蛋白を定量することは可能である。

実施例

以下の実施例は本発明を例証するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

実施例 1. HBVコア関連抗原のシヨ糖密度勾配遠心法による分画

(A) 10～60%シヨ糖密度勾配遠心法による分画

TNE緩衝液 [10mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA] にシヨ糖をそれぞれ10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%と溶解させ、密度の重い60%シヨ糖液から順に1.7mlづつ、12mlの超遠心チューブに注意深く重層させ、室温で6時間放置した。

HBe抗原陽性血清1mlを作製したシヨ糖密度勾配液の上に重層し、

Sw40Tiローター (Beckman) を用いて、33.4Krpm、4℃で15時間の超遠心分離の後、上から300 μ lずつ40分画した。それぞれの画分の密度を計算し、HBVコア関連抗原 (PCT出願:PCT/JP01/06947)、HBc抗原 (PCT出願:PCT/JP01/06947)、HBs抗原 (ダイナボット)、HBe抗原 (ダイナボット)、HBV-DNA PCR (ロシュ・ダイアグノステック) を測定したところ、HBVコア関連抗原の一部はHBe抗原と同様の密度にピークを示したが、大部分のHBVコア関連抗原はHBV-DNA PCRのピーク付近に検出された(図2)。

(B) 低勾配のショ糖密度勾配遠心法による再分画

30%、40%、50%のショ糖液を、密度の重い50%ショ糖液から順に3.4mlずつ、12mlの超遠心チューブに注意深く重層させ、室温で6時間放置する。(A)の24番目と25番目のピーク画分をTE緩衝液[10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA]で2倍に希釈後、作製したショ糖密度勾配液の上に重層し、Sw40Tiローター (Beckman) を用いて、33.4Krpm、4℃で15時間の超遠心分離の後、上から300 μ lずつ40分画した。それぞれの画分の密度を計算し、HBVコア関連抗原 (PCT出願:PCT/JP01/06947、実施例5)、HBc抗原 (PCT出願:PCT/JP01/06947、実施例6)、HBs抗原、HBV-DNA PCRを測定したところ、HBVコア関連抗原のピークはHBV-DNA PCRのピークよりも低密度分画に位置し、その分画にはHBs抗原が含まれていた(図3)。各々のピークを透析後、4℃で保存した。

実施例2. NP-40処理によるゲルろ過

前記実施例1の(A)により分画したピーク画分(24-25番)を0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)(PBS)で平衡化されたSuperose 6 HR(Amersham)を用いてゲルろ過したところ、HBVコア関連抗原とHBc抗原の粒子がそれぞれボイド画分に溶出した(図4上図)。一方、前記実施例1の(A)により分画したピーク画分(24-25番

）にNP-40が最終濃度3%となるように加え、HBs抗原を剥ぎ取るために37℃にて15分間処理した。0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)(PBS)で平衡化されたSuperose 6 HR(Amersham)を用いてこれをゲルろ過したところ、HBVコア関連抗原とHBc抗原からなる裸の粒子がそれぞれボイド画分に溶出した(図4下図)。Superose 6 HRのボイド画分は分子量40,000,000以上であり、これらの分子はウイルスキヤプシド様粒子構造をとっているものと考えられる。

実施例3. ウェスタンブロット法による解析

HBe抗原陽性血清を実施例1の(A)に記載の方法と同様にしてシヨ糖密度勾配遠心を行い、上清から600 μ lずつ20分画する。この分画およびHBe抗原陽性血清を用いてSDS-PAGEを行い、PVDF膜(イモビロン、Millipore)に転写した後、HBc抗原とHBe抗原両方を認識するモノクローナル抗体HB91とHBc抗原のC末端核酸結合領域に特異的なモノクローナル抗体HB50を用いたウェスタンブロットにより、分子量約22000ダルトンのHBVコア関連抗原を検出した(図5上図)。また、このHBVコア関連抗原はHB91には反応するがHB50とは反応しないことが明らかになった(図5下図)。

HB50抗体はエピトープ解析により、168-176番目のアミノ酸(SQSPRRRRS)を認識することがわかっているが、この他に141-159番目のペプチド(STLPETTVVRRRGRSPRRR)および150-167番目のペプチド(RRRGRSPRRRTSPRRRR)にも反応することがわかっている。これらのペプチドの共通配列はSPRRRであり、少なくともこの配列がHB50抗体との結合に必要である。つまり、このSPRRR配列は155番目以降に存在するため、本願発明のHBVプレコア/コア蛋白は155番目以降の配列を欠いているものと考えられる。このことはHB50抗体を標識抗体として単独で用いているHBc抗原測定系でのピークがHBVプレコア/コア蛋白のピークと重ならないことから明らかである(

図 2、図 3)。

実施例 4. MALDI質量分析によるアミノ酸配列の解析

実施例 1 (A) に記載の方法によって得られたHBVコア関連抗原画分を、0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.3)(PBS) で平衡化されたSuperose 6 HR (Amersham) を用いてゲルろ過したところ、HBVコア関連抗原とHBc抗原からなる粒子がボイド画分に溶出した。このボイド画分を1% NP-40, 20%ショ糖を含むTNE緩衝液 [10mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA] 上に重層し、Sw40Tiローター (Beckman) を用いて、33.4Krpm、4℃で15時間の超遠心分離後、HBVコア関連抗原粒子を含むペレットを回収した。

このペレットをSDS-PAGEにて分離し、22kDaのHBVコア関連抗原のバンドを切り出し、トリプシン消化後、Voyager-DE STR (Applied Biosystems) にてMALDI-TOF質量分析を行った。その結果、配列番号2、3、4、5および6の配列に相当する5つのペプチドを検出した。このうち配列番号2のペプチドはN末端アセチル化されていた。

実施例 5. HBVコア関連抗原 (プレコア/コアタンパク) の検出および測定法

抗HBVコア抗原モノクローナル抗体HB44 (認識部位31-49アミノ酸)、HB61 (認識部位131-140アミノ酸) およびHB114 (認識部位1-81アミノ酸) を終濃度がそれぞれ2, 1, 1 μ g/mlになるように0.5 M NaCl, 0.1M炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈し、黒色96ウェルマイクロプレート (ヌンク社) につき100 μ l/ウェル分注し、4℃で一晩静置した。0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) 0.4mlで2回洗浄し、ブロッキング液 (0.5%カゼインナトリウム, 3%スクロース, 150mM NaCl, 10mMリン酸緩衝液 (pH7.4)) 0.4mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。ブロッキング液を除去後

、真空乾燥した。

血清100 μ lに、処理液（15%SDS、2%Tween60）を50 μ l添加し、70℃にて30分間処理をおこない、その50 μ lを測定試料とした。

上記ウェルに反応緩衝液100 μ lと測定試料50 μ lを加え、室温で2時間反応させた。

洗浄液（0.05%Tween20, 0.15M NaCl, 10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4））0.4mlで5回洗浄後、アルカリフォスファターゼ（AP）標識モノクローナル抗体HB91（認識部位1-19アミノ酸）およびHB110（認識部位21-40アミノ酸）をそれぞれ0.1 μ g/ml、0.5 μ g/mlに希釈し、100 μ l/ウェル添加し、室温1時間反応させた。洗浄液0.4mlで6回洗浄後、発光基質としてCDP-Star with Emerald II（TROPIX社）溶液100 μ lを加え室温20分間反応させた後、発光を測定した。

実施例 6 . HBc抗原の測定

（A）抗体固相プレートの作製

HBc抗原およびHBe抗原の両方に反応する3種のモノクローナル抗体HB44（認識部位31-49アミノ酸）、HB61（認識部位131-140アミノ酸）およびHB114（認識部位1-81アミノ酸）をマイクロタイタープレートウェルに感作し、固相化する。PBSで洗浄後、カゼインを含む溶液でブロッキングし、この溶液を除いた後、乾燥させる。

（B）検体の前処理

50 μ lの前処理液（15%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、3%CHAPS、1%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド）を100 μ lの検体（血清、血漿など）と混合し、70℃にて30分処理する。

（C）1次反応

各抗体固相ウェルに100 μ lの反応緩衝液（pH8.0）および前処理した検体を50 μ l加え、穏やかに攪拌しながら室温2時間反応させる。

(D) 2 次 反 応

ウェルを洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識HB50（認識部位168-176アミノ酸）モノクローナル抗体を含む溶液を100 μ l加え、室温1時間反応させる。

(E) 基質反応

ウェルを洗浄後、CDP Star with Emerald II (Applied Biosystems) を100 μ l加え、室温20分間反応後各ウェルの発光量をマイクロプレートルミノメーターで測定する。

実施例 7. 検体中のHBVプレコア蛋白、HBe抗原、HBc抗原の測定とその比率の計算

前記実施例 1 (A)の方法に従って、血清 7 検体についてショ糖密度勾配遠心法により分画を行った。それぞれの検体において、低密度の遊離のHBe抗原を含んでいる分画（例えば図 1 では1-19分画程度）と高密度のウイルス粒子を含んでいる分画（例えば図 1 では20分画以上）に分けて、実施例 5 および実施例 6 の方法で各抗原の測定を行った。

低密度の画分を実施例 5 の方法で測定すると、この画分はウイルス粒子を含んでいない遊離のHBe抗原を測定している。また高密度の画分を実施例 5 の方法で測定すると、この測定方法はHBc抗原と粒子状プレコア蛋白をあわせて測定しているので、実施例 5 で測定した値から実施例 6 の値を減算することにより粒子状HBVプレコア蛋白の値が計測可能である。このようにして測定、計算したHBe抗原、HBc抗原、HBVプレコア蛋白のそれぞれの検体中の比を計算した（表 1）。

表 1 .

検体	H B V プレコア蛋白 ／ H B e 抗原	H B V プレコア蛋白 ／ H B c 抗原
BBI PHM935A-14	13.437	27.236
BBI PHM935A-16	6.321	158.352
BBI PHJ201-04	0.589	22.070
BBI PHJ201-07	1.367	44.853
BBI PHJ201-13	0.296	33.743
ProMedDex#101499	0.025	12.031
ProMedDex#999077	1.653	12.779
平均	3.384	44.438

HBVプレコア蛋白：HBe抗原は13:1～1:40であり、検体によっていずれかの抗原、蛋白を多く含むものが異なっている。一方、HBVプレコア蛋白：HBc抗原は12:1～158:1の範囲であり、すべての検体でHBVプレコア蛋白を多く含んでいる。

表2. 密度勾配遠心によるHBe抗原、HBc抗原、および粒子状HBVプレコアタンパクの分別測定

検体名	HBc抗原			HBVプレコア/コアタンパク			粒子状プレコア タンパク		
	低密度 A pg/ml	高密度 B pg/ml	高密度比 B/(A+B) %	低密度 C pg/ml	高密度 D pg/ml	高密度比 D/(C+D) %	E=D-B pg/ml	E/(C+D) %	
BBi PHM901-06				809	1,038	56%	1,038	56%	
BBi PHM907-10				22,735	2,297	9%	2,297	9%	
BBi PHM921-06				1,436	1,410	50%	1,410	50%	
BBi PHM922-12	100	902	90%	12,977	9,910	43%	9,007	39%	
BCP HBV6278-11	672	137,407	100%	2,217,048	1,027,110	32%	889,703	27%	
Nabi SB0408-J	3,066	164,303	98%	753,697	1,771,119	70%	1,606,816	64%	
BBi PHM935A-14	1,685	171,323	99%	291,285	4,690,058	94%	4,518,735	91%	
BBi PHM935A-16	107	3,511	97%	63,713	573,768	90%	570,257	89%	
ProMedDx #9990776	1,921	63,059	97%	487,502	805,856	62%	742,797	57%	
ProMedDx #10149975	117	3,605	97%	1,708,934	43,372	2%	39,767	2%	
01 1670	3,199	105,916	97%	226,685	137,038	38%	31,122	9%	
01 1351	98	13,630	99%	768,967	351,768	31%	338,138	30%	
01 3567	539	22,518	98%	1,639,314	354,521	18%	332,004	17%	
01 2296	31	2,172	99%	386,067	36,338	9%	34,166	8%	
01 1188	12	578	98%	1,393	2,088	60%	1,509	43%	
01 2877	108	4,863	98%	79,403	72,987	48%	68,124	45%	

それぞれの分画のHBc抗原、HBVコア関連抗原測定値および、それから計算される粒子状プレコアタンパク濃度を表2に示す。定量可能であった全例でHBc抗原の90%以上は高密度分画に存在した。低密度分画に存在するHBVプレコア／コアタンパクはHBe抗原であり、高密度分画中HBVプレコア／コアタンパクはHBc抗原および粒子状HBVプレコアタンパクである。したがって、高密度HBVプレコア／コアタンパク濃度よりHBc抗原濃度を減じることにより、粒子状プレコアタンパク濃度を算出することができる。

実施例 8. 検体中の遊離および粒子状HBVプレコア／コアタンパク、およびHBc抗原の分別測定とその比率

HBVダイレクト-Magキット（JSR株式会社）の「反応バッファー」50 μ l、「HBV補足粒子」（抗HBs抗体固相化磁気ビーズ）50 μ l、および検体200 μ lを混合し室温30分間振とうし、HBs抗原を含むHBV関連粒子を結合させた。これを強力な磁石により磁気ビーズを分離し、上清を除いた。この上清には遊離HBe抗原が含まれる。残った磁気ビーズに15% SDS溶液を60 μ l加え、70℃10分加熱することにより、結合していた粒子状HBVプレコア／コアタンパクを溶出した。これを強力な磁石により磁気ビーズを分離し、抽出物を取り出した。

この上清および沈殿抽出物中のHBVプレコア／コアタンパクおよびHBcAgをそれぞれ実施例5、実施例6の方法で測定し、検体中のHBe抗原、HBc抗原、粒子状HBVプレコアタンパクのそれぞれの濃度および比率を計算した。結果を表3に示す。

表3. HBs抗体免疫沈降によるHBe抗原、HBc抗原、および粒子状HBVプレコアタンパクの分別測定

検体名	HBc抗原			HBVプレコア/コアタンパク			粒子状プレコア タンパク		
	上清 A pg/ml	沈殿 B pg/ml	沈殿比 B/(A+B) %	上清 C pg/ml	沈殿 D pg/ml	沈殿比 D/(C+D) %	E=D-B pg/ml	比 E/(C+D) %	
BBi PHM901-06	5	69	93%	2,151	948	31%	879	28%	
BBi PHM907-10	5	207	98%	29,728	2,219	7%	2,012	6%	
BBi PHM921-06	3	76	96%	2,723	1,307	32%	1,231	31%	
BBi PHM922-12	46	749	94%	20,025	10,364	34%	9,615	32%	
BCP HBV6278-11	5,238	118,840	96%	4,958,186	941,077	16%	822,237	14%	
Nabi SB0408-J	4,296	116,834	96%	1,382,054	1,829,461	57%	1,712,627	53%	
BBi PHM935A-14	8,671	188,535	96%	1,636,481	3,370,973	67%	3,182,438	64%	
BBi PHM935A-16	959	7,800	89%	482,713	591,319	55%	583,519	54%	
ProMedDx #9990776	6,264	52,270	89%	1,646,640	1,184,289	42%	1,132,020	40%	
ProMedDx #10149975	477	4,522	90%	2,094,278	146,459	7%	141,937	6%	
01 1670	2,877	137,930	98%	540,397	177,755	25%	39,825	6%	
01 1351	535	32,615	98%	2,168,349	414,203	16%	381,588	15%	
01 3567	1,409	40,800	97%	5,325,365	325,486	6%	284,686	5%	
01 2296	198	5,319	96%	1,036,210	59,531	5%	54,212	5%	
01 1188	23	692	97%	5,171	2,151	29%	1,460	20%	
01 2877	555	11,692	95%	161,907	126,510	44%	114,818	40%	

定量可能であった全例でHBc抗原の90%以上は沈殿に存在した。すなわち、HBs抗原に覆われた粒子は、ほぼ全て免疫沈降される。上清中に存在するHBVプレコア／コアタンパクはHBe抗原であり、沈殿中HBVプレコア／コアタンパクはHBc抗原および粒子状HBVプレコアタンパクである。したがって、沈殿中HBVプレコア／コアタンパク濃度よりHBc抗原濃度を減じることにより、粒子状プレコアタンパク濃度を算出することができる。この濃度および比率は実施例7に示した密度勾配遠心による分別測定結果と非常に似通った値となっており、双方の測定法で粒子状プレコアタンパクの分別測定ができることを示している。

実施例 9. 粒子状HBVプレコアタンパク比の病態による違い

実施例 8 と同様にしてHBVキャリアおよびB型肝炎の様々な病態における血清検体計81例について、遊離および粒子状HBVプレコア／コアタンパク、およびHBc抗原を分別測定し、粒子状HBVプレコアタンパクの全プレコア／コアタンパク（HBe抗原＋HBc抗原＋粒子状HBVプレコアタンパク）に対する比率を比較した。結果を図 6 に示す。

HBe抗原陽性例では急性肝炎で高く無症候性キャリアや肝硬変では低い傾向が認められた。また、HBe抗体陽性例では、慢性肝炎や肝癌例で高く、急性肝炎治癒後や肝硬変で低い傾向が認められた。これらの結果から、粒子状プレコアタンパクを測定することにより、B型肝炎の診断、治療に有用な知見を得ることができ、さらにHBVやB型肝炎の病態の解明に役立てることができる。こうした知見を通して、B型肝炎の治療薬の開発にも有用な知見が得られる。

実施例10. 検体処理法の比較

種類の検体前処理液を作製し、実施例 6 と同様にして前処理液だけを変化させHBV陽性血清 5 検体の検体処理およびHBc抗原の測定を

行い、各処理法の効果を比較した。

このうちSDS, N-Lauroyl sarcosin-Na, Deoxycholic Acid-Naは陰イオン性界面活性剤であり、n-Decyl trimethyl ammonium-Brは陽イオン性界面活性剤である。検体処理中の各界面活性剤の終濃度は前処理液中の1/3に、HBc抗原測定系における1次反応中の終濃度は1/9となる。

表4. 各処理法でのHBc抗原ELISAでの反応（発光量）

前処理液	なし	15% SDS	15% N-Lauroyl sarcosin-Na	7.5% Deoxycholic Acid-Na	15% n-Decyl trimethyl ammonium-Br
陰性	180	154	158	156	503
検体 1	364	46656	4208	1375	1381
検体 2	212	4249	510	459	357
検体 3	151	2157	1323	141	311
検体 4	167	2487	430	143	292
検体 5	153	1609	300	180	378

この結果から処理液としてSDS, N-Lauroyl sarcosin-Na, Deoxycholic Acid-Naなどの陰イオン性界面活性剤が適していることが明らかとなった。このうち特にSDSが適している。一方n-Decyl trimethyl ammonium-Brなどの陽イオン性界面活性剤を単独で用いることは、陰性検体でのバックグラウンドも高く、この測定系には適さない（表4）。

表 5 . 各処理法での HBc 抗原 ELISA での反応 (発光量)

前処理液	15% SDS	15% SDS, 1.5% CHAPS	15% SDS, 1.5% CHAPS 0.3% Triton-X100
陰 性	29	26	42
検 体 1	35009	45368	50818
検 体 2	2323	3739	4316
検 体 3	541	903	1046
検 体 4	1327	2048	2158
検 体 5	532	690	773

この結果から前処理液として15% SDSに加え、両性界面活性剤であるCHAPSあるいはさらに非イオン性界面活性剤であるTriton-X100などを加えることにより、前処理の効果がさらに高くなることが明らかとなった(表5)。

実施例11. 粒子状HBVプレコアタンパクの抗原性

抗HBcモノクローナル抗体 (Anti-HBc(β) 2A22特殊免疫研究所) を1 μ g/mlに0.5M NaCl, 0.1M炭酸-Na緩衝液(pH9.6)で希釈し、96ウェルマイクロプレート (NUNC社) に100 μ l/ウェル分注し、4℃一晩静置した。PBSで洗浄後、カゼインを含む溶液でブロッキングし、この溶液を除いた後、検体溶液を100 μ l/ウェル加え、室温1時間反応させた。洗浄液で洗浄後、1 μ g/mlのビオチン標識2A22モノクローナル抗体を100 μ l/ウェル加え、室温1時間反応させた。洗浄液で洗浄後、10,000倍希釈のペルオキシダーゼ標識アビジン (Vector社) を、100 μ l/ウェル加え、室温1時間反応させた。洗浄液で洗浄後、OPD(SIGMA社)/過酸化水素溶液を100 μ l/ウェル加え、室温30分間呈色反応させた。1M硫酸を100 μ l/ウェル加え、反応を停止させた後、420 nm吸光度を測定した。

この測定系では、約2 ng/mlのHBcAgを検出可能であった。実施例1(A)のHBVコア関連抗原のピーク分画を1% NP-40で処理してエンベロープを除去した後、10倍希釈し(HBVコア関連抗原含量約150 ng/ml)上記の測定を行ったが、HBc抗原は検出されなかった。

また、同じ検体を臨床的に用いられているHBe抗原測定系(ダイナボット社)にて測定したが、やはりHBe抗原は検出されなかった。したがって、本発明の粒子状HBVプレコアタンパクは、HBc抗原、HBe抗原とは異なる抗原性を有していると考えられる。

請 求 の 範 囲

1. HBVのコア様粒子形成能を有する、シグナル配列の全部または一部を含むHBVプレコア蛋白。
2. HBVのコア様粒子形成能を有する、アミノ酸配列のN末端が－28番目でありC末端が150番目から154番目のいずれかである、HBVプレコア蛋白。
3. 配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる請求項1に記載のHBVプレコア蛋白。
4. 請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコア蛋白を含んでなるHBVコア（様）粒子またはHBVウイルス（様）粒子。
5. 請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコア蛋白を含んでなるHBVワクチン、または治療薬。
6. 請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコア蛋白を含んでなるHBV診断薬または診断キット。
7. 請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコア蛋白を測定する方法。
8. 請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコア蛋白を露出させる工程、HBVプレコア蛋白を認識するプローブと結合する工程を含む請求項7に記載の方法。
9. 前記HBVプレコア蛋白を露出させる工程が界面活性剤の処理または添加である請求項7または8に記載の方法。
10. 前記界面活性剤が陰イオン性界面活性剤、または陰イオン性界面活性剤および両イオン性界面活性剤、または陰イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤のいずれかである請求項7～9のいずれか1項に記載の方法。
11. 前記HBVプレコア蛋白に結合するプローブがアミノ酸配列の

－28～－11に結合するプローブまたは請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコア蛋白に特異的に結合し、HBe抗原あるいはHBc抗原には結合しないプローブである請求項7～10のいずれか1項に記載の方法。

12. 前記HBVプレコア蛋白に結合するプローブが抗体である請求項7～11のいずれか1項に記載の方法。

13. 前記抗体がアミノ酸配列の1番目から19番目を認識する抗体、21番目から40番目を認識する抗体、31番目から49番目を認識する抗体、130番目から140番目を認識する抗体、1番目から81番目の構造領域を認識する抗体の中から選択される2つ以上の抗体の組み合わせである請求項7～12のいずれか1項に記載の方法。

14. 抗HBs抗体等のHBs抗原に結合するプローブにより（免疫）沈降し、沈降物中のHBVプレコア/コアタンパクを測定することにより、粒子状HBVプレコア/コアタンパクを測定する方法。

15. 請求項7～13のいずれか1項に記載の方法により測定したHBVプレコア蛋白の測定値にHBe抗原の値が含まれている場合に、HBe抗原の測定値を減算することにより算出する検体中の粒子状HBVプレコア/コア蛋白の値を測定する方法。

16. 請求項7～15のいずれか1項に記載の方法により測定したHBVプレコア/コア蛋白の測定値よりHBc抗原の測定値を減算することにより算出する検体中の粒子状HBVプレコア蛋白の値を測定する方法。

17. 請求項7～16のいずれか1項に記載の方法で測定したHBVプレコア蛋白の定量をHBV感染あるいはB型肝炎の病態マーカーとして利用する方法。

18. 陰イオン性界面活性剤およびHBVプレコア蛋白の－28～150番目のアミノ酸を認識する抗体を含む測定キットおよびHBe抗原を測

定するキットを含む診断薬。

19. 陰イオン性界面活性剤およびHBVプレコア/コアタンパクの28～150アミノ酸を認識する抗体、および粒子状HBVプレコア/コアタンパクとHBe抗原を分離する抗体を含む測定キットおよび診断薬。

20. 請求項1～3のいずれか1項に記載のHBVプレコアタンパクに対する抗体を検出する方法。

21. HBVプレコアタンパクを含む粒子状HBVプレコアタンパクに対する抗体を測定する測定キットおよび診断薬。

Fig.1

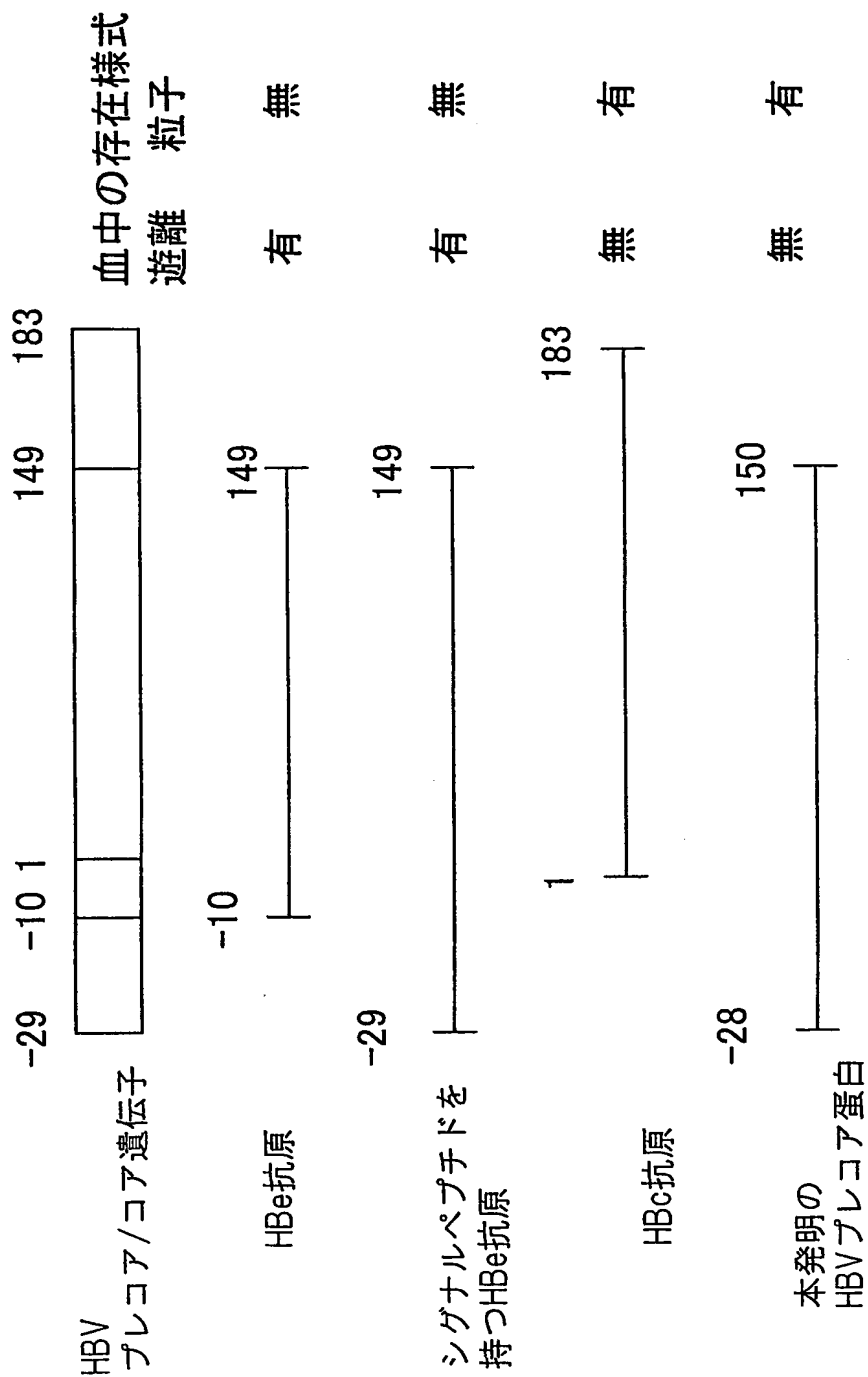


Fig.2

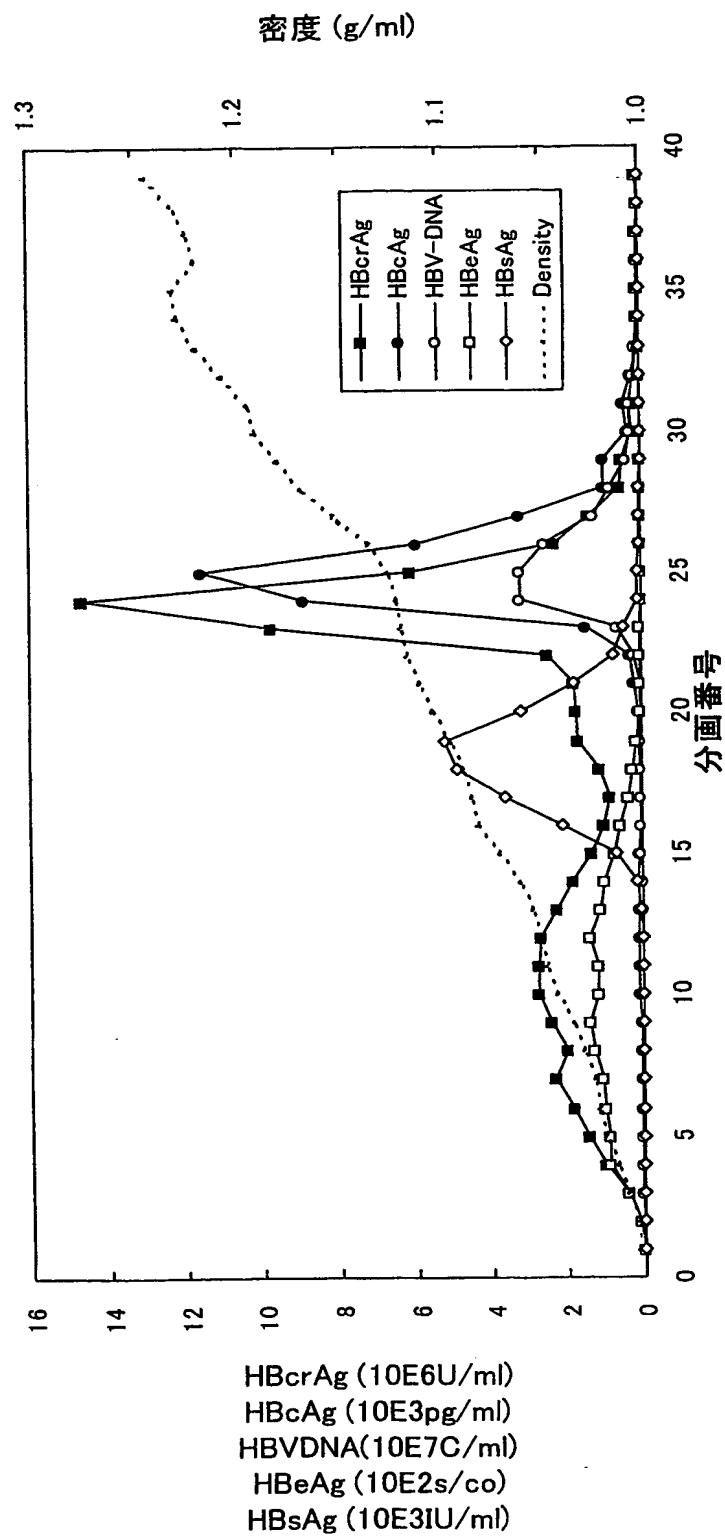


Fig.3

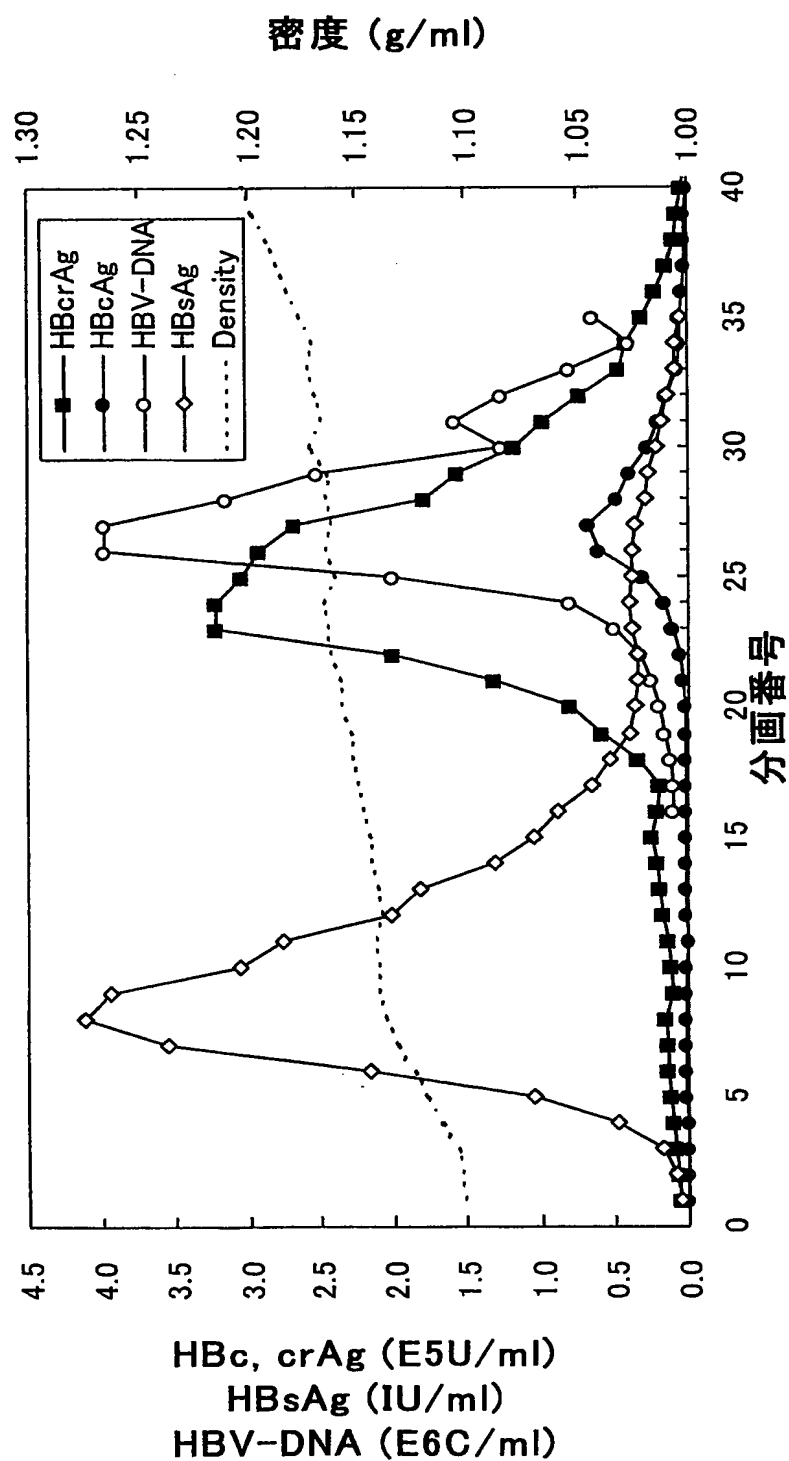


Fig. 4

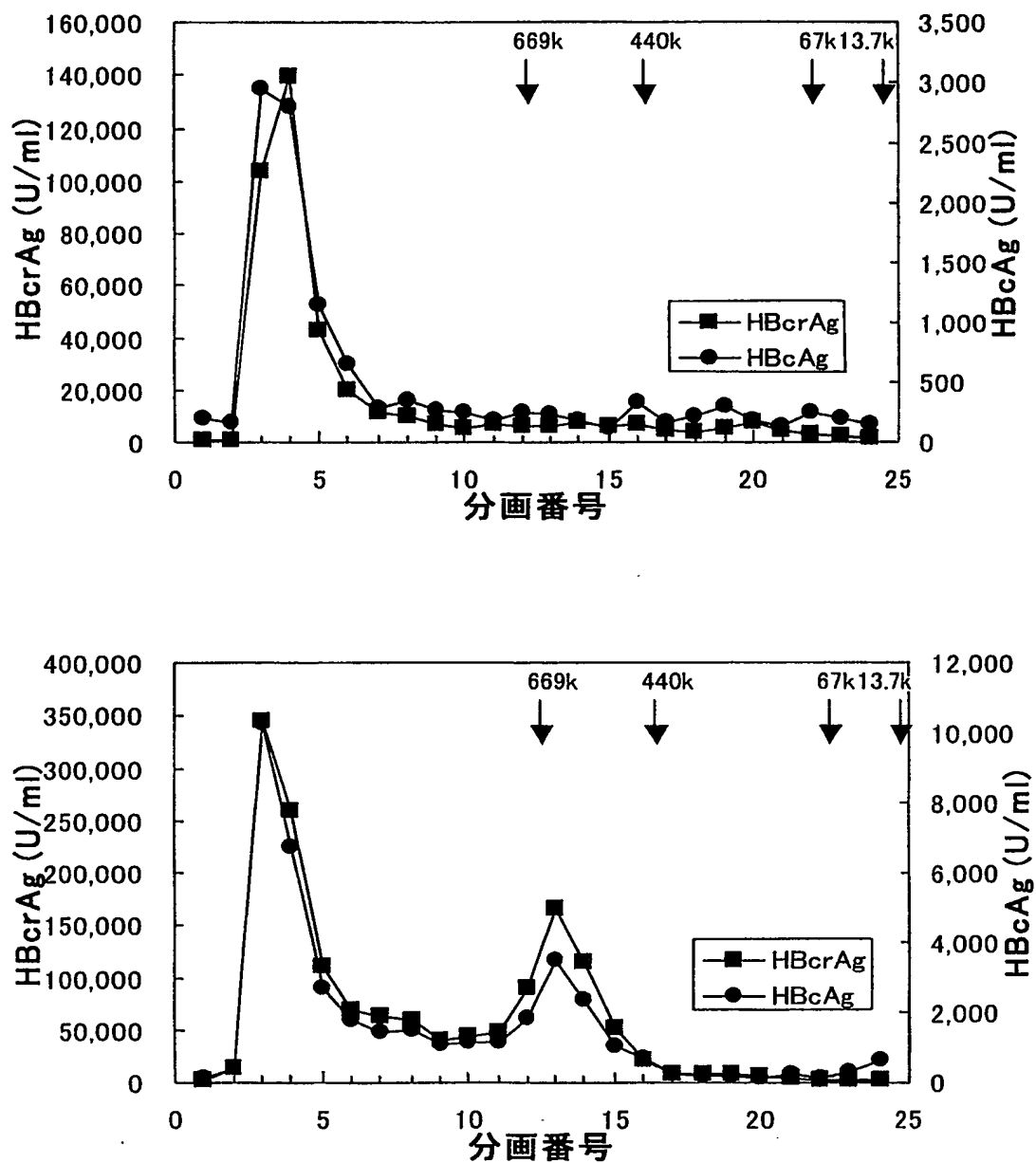


Fig.5

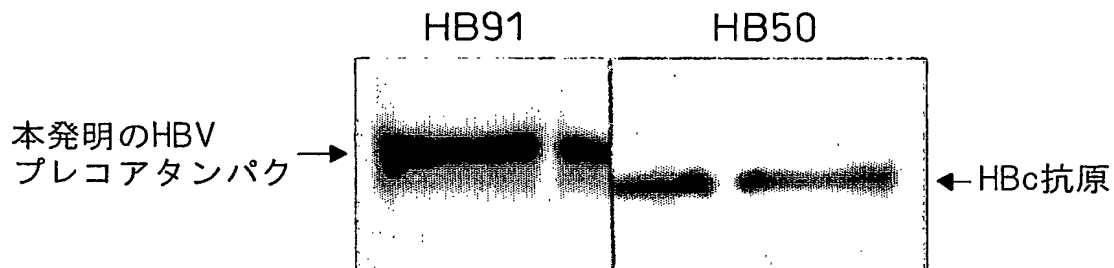
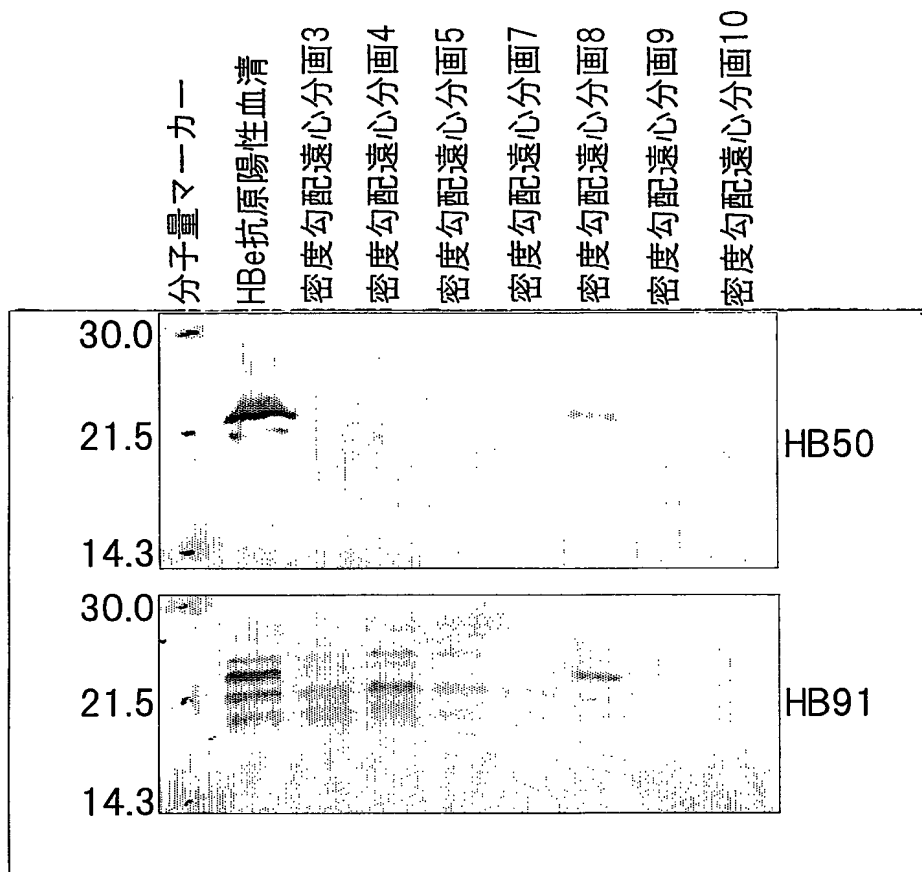
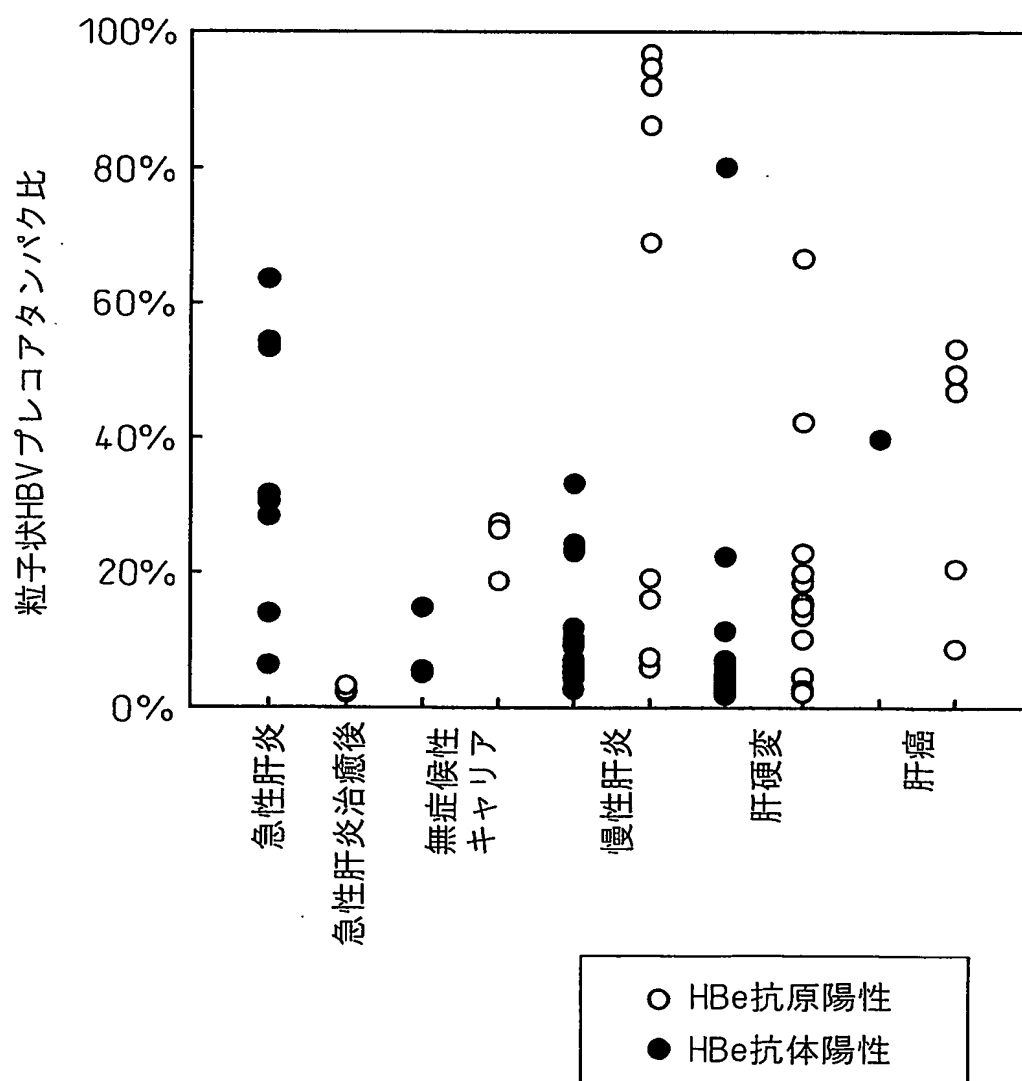


Fig. 6



SEQUENCE LISTING

<110> Advanced Life Science Institute, Inc.

<120> HBV precore protein having particle forming ability

<130> 1024582

<160>

<210> 1

<211> 178

<212> TRP

<400> 1

Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr Val

5

10

15

Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp

20

25

30

Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro

35

40

45

Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala

50

55

60

Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His

65

70

75

80

Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu

85

90

95

Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu

100

105

110

Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu

115

120

125

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu

130

135

140

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
145 150 155 160

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
165 170 175

Val Arg

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<400> 2

Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr Val
5 10 15

Gln Ala Ser Lys

20

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<400> 3

Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg

5

10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<400> 4

Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu
5 10 15

Arg

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<400> 5

Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys

5

10

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<400> 6

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu

5

10

15

Pro Glu Thr Thr Val Val Arg

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/02, C12N7/00, G01N33/576, A61K39/29, A61P1/16,
A61P31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/02, C12N7/00, G01N33/576, A61K39/29, A61P1/16,
A61P31/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/14871 A1 (Advanced Life Science Institute, Inc.), 21 February, 2002 (21.02.02), & EP 1308730 A1	1-21
A	WO 01/40279 A2 (INNOGENETICS N.V.), 07 June, 2001 (07.06.01), & EP 1104811 A1 & EP 1234040 A1 & CA 2392853 A & AU 2358201 A	1-21
A	KIMURA T. et al., Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load., J.Clin. Microbiol., 2002 Feb., Vol.40, No.2, pages 439 to 445.	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 October 2003 (03.10.03)Date of mailing of the international search report
21 October, 2003 (21.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11389

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAKAHASHI, K. et al., Molecular heterogeneity of e antigen polypeptides in sera from carriers of hepatitis B virus., J.Immunol.1991, Vol.147, No.9, pages 3156 to 3160	1-21
A	SAKAMOTO, Y. et al., Full and empty particles of hepatitis B virus in hepatocytes from patients with HBsAg-positive chronic active hepatitis., Lab.Invest.1983, Vol.48, No.6, pages 678 to 682	1-21
A	TERRE S. et al., Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo., J.Virol.1991, Vol.65, No.10, pages 5539 to 5543	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/02, C12N 7/00, G01N 33/576, A61K 39/29, A61P 1/16, A61P 31/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/02, C12N 7/00, G01N 33/576, A61K 39/29, A61P 1/16, A61P 31/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/14871 A1 (株式会社先端生命科学研究所) 2002. 02. 21 & EP 1308730 A1	1-21
A	WO 01/40279 A2 (INNOGENETICS N.V.) 2001. 06. 07 & EP 1104811 A1 & EP 1234040 A1 & CA 2392853 A & AU 2358201 A	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 10. 03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KIMURA T. et al, Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. J. Clin. Microbiol. 2002 Feb. , Vol. 40, No. 2, p. 439-445	1-21
A	TAKAHASHI K. et al, Molecular heterogeneity of e antigen polypeptides in sera from carriers of hepatitis B virus. J. Immunol. 1991, Vol. 147, No. 9, P. 3156-3160	1-21
A	SAKAMOTO Y. et al, Full and empty particles of hepatitis B virus in hepatocytes from patients with HBsAg-positive chronic active hepatitis. Lab. Invest. 1983, Vol. 48, No. 6, p. 678-682	1-21
A	TERRE S. et al, Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. J. Virol. 1991, Vol. 65, No. 10, p. 5539-5543	1-21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.